

IVAN ZULIAN

**AÇÃO DO SULFATO DE CONDROITINA “A” ASSOCIADO
À CIPROFLOXACINA EM ÚLCERAS DE CÓRNEA
PRODUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM CAVALOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Patologia
Veterinária, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Antônio Felipe P. F. Wouk

Co-orientadora: Prof.^a Itáira Susko

CURITIBA

2002



PARECER

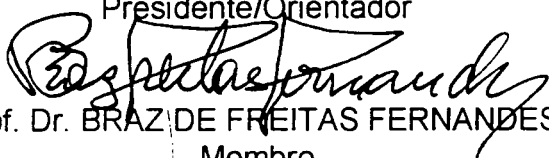
A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **IVAN ZULIAN** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:


- 1) A Tese, intitulada **“Ação do Sulfato de Condroitina “A” Associada a Ciprofloxacina em Úlceras de Córnea Produzidas Experimentalmente em Cavalos”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se **houve** muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o conceito **“A”** concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 24 de Setembro de 2002.


Prof. Dr. ANTONIO FELIPE PAULINO DE FIGUEIREDO WOUK
Presidente/Orientador


Prof. Dr. BRAZ DE FREITAS FERNANDES
Membro


Prof. Dr. IVAN DECONTO
Membro

IVAN ZULIAN

**“AÇÃO DO SULFATO DE CONDROITINA “A” ASSOCIADO A
CIPROFLOXACINA EM ÚLCERAS DE CÓRNEA PRODUZIDAS
EXPERIMENTALMENTE EM CAVALOS”**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Patologia Veterinária, do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Antonio Felipe P.F. Wouk
Co-orientadora: Prof^a Itáira Susko

**CURITIBA
2002**

DEDICO E OFEREÇO

A ESPOSA SIRLEI.

Com todo amor, a minha querida mulher que nesses anos todos esteve sempre ao meu lado, incentivando-me através do seu exemplo, entusiasmo e dedicação as alegrias hoje atingidas, são nossas, pois teu carinho, estímulo e companheirismo, proporcionaram essa vitória.

AO PROFESSOR FELIPE

A minha gratidão e admiração, ao amigo professor e orientador que além da competência profissional nos brindou com extrema paciência e cavalheirismo.

Obrigado Felipe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos Ivan e Cíntia que me ajudaram com a sua presença e incentivo.

A co-orientadora Professora Itaira Susko, pela colaboração sempre presente.

Ao Comandante do Regimento de Cavalaria Coronel Dulcídio da Polícia Militar do Paraná; Tenente Coronel Itamar Santos, pela permissão da realização do experimento.

Ao Centro Veterinário da Polícia Militar, em nome do Capitão Dr. Paulo Eduardo Caron, Capitão Dr. Valdir Roberto Tonin, Sargento Juarez Afonso Scapin, Cabo Afonso Carlos Ferreira e João Roberto Rieck, pela ajuda nos trabalhos realizados naquele local com eficiência e dedicação.

Ao professor João Ricardo Dittrich, na elaboração da análise estatística, e pela confecção dos gráficos.

As bibliotecárias da biblioteca do Setor de Ciências Agrárias pela valiosa colaboração na pesquisa bibliográfica realizada.

Aos Secretários do Curso de Pós-Graduação de Veterinária, Francisco Gerber e do Departamento de Medicina Veterinária, Dorly Bento de Andrade, pela ajuda e amizade.

A nossa gratidão às Médicas Veterinárias, Ana Letícia J. de Souza e Graziela Muller, pela paciência demonstrada durante todo o tempo.

Ao professor Ivan Deconto, pelas dicas e correções desta dissertação.

A professora Adriana Busato, pela confecção das fotos.

Ao professor Murilo Nichele, grande amigo, que nos motivou com sua coragem e otimismo.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	ii
	RESUMO.....	v
	ABSTRACT.....	vii
1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	7
	2.1 ANIMAIS.....	7
	2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	7
	2.2.1 Grupos experimentais.....	7
	2.2.2 Indução Cirúrgica das úlceras de córnea.....	7
	2.2.3 Protocolo de Tratamento.....	8
	2.2.4 Avaliação Clínica.....	8
	2.2.5 Análise Estatística.....	9
3	RESULTADOS.....	10
	3.1 Avaliação Clínica.....	10
	3.2 Avaliação Estatística.....	25
4	DISCUSSÃO.....	27
5	CONCLUSÃO.....	30
6	REFERÊNCIAS	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ocorrência, em dias, da epitelização da córnea de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina.....	14
FIGURA 2	Ocorrência, em dias, de blefarospasmo em olhos de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina.....	14
FIGURA 3	Ocorrência, em dias, de edema em córneas de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina.....	15
FIGURA 4	Ocorrência, em dias, de epífora em olhos de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina.....	15
FIGURA 5	Ocorrência, em dias, de neovascularização em córneas de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina.	16
FIGURA 6	Ocorrência, em dias, de fotofobia em olhos de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina.....	16
FIGURA 7	Imagem de olho eqüino submetido à trepanação da córnea no eixo pupilar..	17
FIGURA 8	Imagem de olho eqüino com eversão do bordo epitelial corneano, após trepanação.....	17
FIGURA 9	Imagem de olho eqüino com úlcera experimental de córnea corada pela fluoresceína.....	18

FIGURA 10	Imagem de olho direito (controle) eqüino com cinco dias de evolução: notar a presença de edema e úlcera com fundo transparente em posição de “11 horas”	18
FIGURA 11	Imagem de olho esquerdo (a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina) eqüino com cinco dias de evolução: notar leucoma com ausência de edema e epitelização presente.....	19
FIGURA 12	Imagem de olho direito (controle) eqüino aos nove dias de tratamento: notar presença de úlcera corneana recém epitelizada.....	19
FIGURA 13	Imagem de olho esquerdo eqüino aos nove dias de tratamento com a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar presença de mínimo leucoma.....	20
FIGURA 14	Imagem de olho direito (controle) eqüino aos nove dias de tratamento: notar presença de úlcera em atividade com fundo transparente em posição de “6 horas”	20
FIGURA 15	Imagem de olho esquerdo eqüino aos nove dias de tratamento com a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar cicatrização a termo com mínimo leucoma.....	21
FIGURA 16	Imagem de olho direito (controle) eqüino aos 10 dias de tratamento: notar presença de úlcera corneana recém epitelizada.....	21
FIGURA 17	Imagem de olho esquerdo eqüino aos 10 dias de tratamento com a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar presença de discreto leucoma.....	22
FIGURA 18	Imagem de olho direito (controle) eqüino aos 15 dias de tratamento: notar presença de leucoma denso.....	22
FIGURA 19	Imagem de olho esquerdo eqüino aos 15 dias de tratamento com a associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar presença de discreto leucoma.....	23

- FIGURA 20 Imagem de olho direito (controle) eqüino aos cinco meses de evolução: 23
notar presença de leucoma.....
- FIGURA 21 Imagem de olho esquerdo eqüino aos cinco meses de evolução, após 24
tratamento com a associação de sulfato de condroitina “A” e
ciprofloxacina: notar ausência de leucoma.....

RESUMO

As úlceras corneanas são afecções oculares de grande importância na espécie equina, devido às alterações oculares que decorrem delas, as quais comprometem a função visual normal da espécie podendo acarretar uma série de danos e perdas econômicas. Os glicosaminoglicanos possuem ação inibidora da plasmina, uma enzima fibrinolítica encontrada em grandes concentrações em córneas lesadas, ação anabólica sobre fibroblastos, condrócitos e sinoviócitos. Estudaram-se os efeitos da ciprofloxacina associada ao sulfato de condroitina “A”, um glicosaminoglicano de uso tópico, sobre a cicatrização de úlceras corneanas em eqüinos. Para isto, utilizaram-se cinco cavalos totalizando dez olhos, nos quais a córnea foi submetida à trepanação central e observação durante 24 horas até a confirmação de presença de úlcera profunda de córnea. Considerando-se cada animal como o controle dele mesmo, os olhos direitos foram utilizados como grupo de controle, instilando-se colírio de tobramicina, quatro vezes ao dia e, os olhos esquerdos foram submetidos ao tratamento com sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina, duas vezes ao dia. Os cavalos sofreram exame clínico e oftalmoscopia direta diariamente, biomicroscopia em lâmpada de fenda em dias alternados, durante trinta dias, para avaliação subjetiva quali-quantitativa dos parâmetros referentes ao blefarospasmo, fotofobia, epífora, quemose, edema de córnea e pannus. A prova de retenção de fluorsceína foi realizada a cada dois dias para confirmação e acompanhamento da evolução das úlceras, que foram consideradas curadas quando não mais ocorria retenção do corante. Comparando-se os olhos controle, os olhos tratados com sulfato de condroitina e ciprofloxacina apresentaram precocemente redução dos sinais clínicos e preenchimento do leito da úlcera com tecido cicatricial, além de melhor qualidade de cicatrização, obtendo sucesso de 80% no processo, em duas semanas. Já os olhos utilizados como controle, apresentaram formação importante de edema de córnea e neovascularização (pannus), e a redução dos sinais clínicos e a cicatrização iniciaram-

se tardiamente, resultando em discreto leucoma. O confronto entre os grupos permite inferir que a solução de sulfato de condroitina “A” associada a ciprofloxacina quando instilada sobre a córnea ulcerada de eqüinos promove cicatrização rápida e de melhor qualidade.

Palavra-chave: Úlceras Corneanas, Glicosaminoglicano.

ABSTRACT

The corneal ulcers have a great importance a in the ocular affection of the horses because they can cause ocular alterations that may impair the normal visual function of these animals and still can bring a lot of damage and economic loss. This study was conducted to evaluate the potencial efficacy of one association of ciprofloxacin and condroitin sulfate, a polisulfated glycosamynoglycan (PSGAG), topically used, on the healing of experimental induced corneal ulcers in horses. PSGAG has a inhibitory action of plasmin, fibrinolytic enzyme found at high concentration in corneal wounds, and it has an anabolic effect on fibroblasts, chondrocytes and synoviocytes. Five horses and their ten eyes were employed. Every animals corneal tissue were submitted to trephination and after that they were watched during one day until onset of clinical signs. Considering each animal as itself control, the right eyes were the control group treated with tobramycin drops, four times a day, and the left eyes were treated with association of condroitin sulfate and ciprofloxacin drops, twice a day. The horses were monitored every two days during thirty days, using a slit lamp biomicroscopy, direct ophthalmoscopy and clinical examination, evaluating subjectively blefarospasm, photophobia, ephifora, quemosis, corneal edema, neovascularization (pannus) and de-epithelialization. The fluorescein test was performed every two days in order to verify the ulcers. They were considered healing with negative fluorescein. Comparing outcomes, the treated eyes with condroitin, sulfate ciprofloxacin showed early decrease of clinical signs and filling in corneal ulceration with healing tissue beyond the most effect of healing with 80% of healing in two weeks. The control eyes presented an important corneal edema and neovascularization (pannus) and there was only decrease of clinical signs and healing later on with circumspect leukoma formation. Comparison between the groups allowed to conclude that the association of condroitin sulfate and ciprofloxacin drops applied on corneal ulcers of horses induced fast and most effect healing.

KEY-WORDS: CORNEAL ULCER, GLICOSAMYNOGLYCAN

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A córnea compõe um quinto da túnica fibrosa do globo ocular, é transparente, avascular, incolor, de contorno circular e reveste a superfície anterior do bulbo. Sua espessura varia entre as espécies e geralmente não ultrapassa 1,0 mm (SLATTER, 1990; SAMUELSON, 1991). A ausência de vascularização na córnea gera uma relação de dependência entre a mesma e os capilares límbicos, do humor aquoso e do filme lacrimal para sua nutrição e difusão de metabólicos (BANK, 1992; SAMUELSON, 1999).

O nervo oftálmico, precedente do nervo trigêmio, é responsável pela inervação da córnea (DICE et al., 1990). Os troncos nervosos penetram no estroma pelo limbo, distribuem-se radialmente no epitélio, formando terminações nervosas livres, razão pela qual as úlceras superficiais são mais dolorosas, comparativamente às úlceras profundas (COLLINS, 1996).

Nos animais, a córnea é composta por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (SAMUELSON, 1991). O filme lacrimal, proposto como quinta camada por SLATTER (1990) e SCHOENAU & PIPPI (1993), mantém a superfície corneana lisa e brilhante, preservando o aspecto de “espelho”, cuja importância se destaca nos mecanismos de refração (PATON, 1995).

O epitélio é o tipo pavimentoso estratificado não queratinizado e representa uma continuação do epitélio conjuntival (HELPER, 1989; SCHOENAU & LIPPI, 1993; KIRSCHNER et al., 1986). As células basais (células colunais altas) sofrem mitose e ao se exteriorizarem, tornam-se achatadas. O fenômeno deve-se aos processos descamativos (SLATTER, 1990), que estabelecem o aparecimento de células poligonais e escamosas superficiais (MURPHY & POLLOCK, 1993).

O estroma corresponde a 90% da espessura da córnea (SLATTER, 1990; SEVERIN, 1991) e, conforme SLATTER (1990) e COLLINS (1996), é composto por fibroblastos ceratócitos, substância fundamental e colágeno, principal componente. As fibras colágenas, predominantemente dos tipos I e II (SEVERIN, 1991; WHITLEY, 1991), encontram-se ordenadas paralelamente, formando lamelas de interposição ocasional de linfócitos,

macrófagos e neutrófilos e seu espaçamento regular contribui para a transparência da córnea (SLATTER, 1990).

Os ceratócitos são responsáveis pela síntese de colágeno, mucoproteínas da substância fundamental e glicosaminoglicanos (WARING, 1984). Estes últimos são compostos por sete tipos, quais são: hialuronato de sódio, sulfato de condroitina 4 e condroitina 6, sulfatos de dermatano, heparano e heparina. Na ocorrência de lesões corneanas, os ceratócitos são mobilizados para a manutenção e regeneração do estroma (WHITLEY, 1991), através da migração de regiões adjacentes, próximas ao endotélio, para repolarizarem a área lesada (WAGONER, 1997), transformando-se em fibroblastos (FINI et al., 1992).

A membrana de Descemet apresenta aparência homogênea e é predominantemente acelular, embora possua duas camadas de células pobremente definidas, cuja observação é permitida por microscopia eletrônica de transmissão (WARNIG, 1984; SCHOENAU & PIPPI, 1993). Uma camada encontra-se adjacente ao estroma, composta por fibras de colágeno tipo I e II, que se espessa com o passar da idade (WARNIG, 1984; SLATTER, 1990), enquanto que a outra é do tipo basal e atua como barreira à invasão do estroma por leucócitos e vasos sangüíneos (WARING, 1984).

O endotélio reveste a face interna da córnea (GIRARD, 1981), sendo formado por uma única camada de células hexagonais achatadas, conectadas entre si por desmossomos (GIRARD, 1981; NAUMANN & SAUTTER, 1988). Inúmeras mitocôndrias estão contidas nas células endoteliais, devido a sua elevada taxa metabólica (SLATTER, 1990). E considerando-se que estas últimas são banhadas pelo humor aquoso, depreende-se que são importantes na manutenção do estado de deturgescência da córnea, controlado pela bomba de sódio e potássio (COLLINS, 1996). O epitélio e endotélio são hidrofóbicos e, por isso, quando intactos, controlam o grau de hidratação da córnea (SLATTER, 1990). Desta forma, perdas teciduais mínimas do endotélio podem traduzir-se em edema corneano (WHITLEY, 1991).

A nutrição e eliminação de catabólicos da córnea são realizadas pelo humor aquoso, filme lacrimal e vasos do limbo (SAMUELSON, 1991). Sua oxigenação ocorre através do humor aquoso, filme pré-corneano, plexo capilar límbico, capilares da conjuntiva palpebral e ar atmosférico (SLATTER, 1990). A córnea, ao contrário da esclera é transparente e

avascular, não possui pigmentos; no entanto possui arranjo regular em suas fibras estromais (SLATTER, 1990). Barreiras fisiológicas atuam na sua proteção, visando dificultar a invasão e colonização por microrganismos da microbiota normal. Anotam-se, dentre as mais significativas, as integridades das superfícies epitelial e conjuntival, a ação mecânica das pálpebras e o espriamento da lágrima, rica em agentes antibacterianos como lizozima, β -lisina e lactoferrina (EICHENBAUM et al., 1987; KERN, 1990).

A córnea é considerada sítio de privilégio imunológico face ao limitado acesso de anticorpos humorais e de leucócitos citotóxicos circulantes. Como mecanismos compensatórios, são processados pela conjuntiva e pelo trato uveal, que juntos representam os centros linfóides ativos ao bulbo ocular (EICHENBAUM et al., 1987). As “stem cells” são indispensáveis para a integridade da superfície corneana, promovendo sua renovação em condições normais e reepitelização em processos reparatórios (SWIFT et al., 1996; HAAMANN et al., 1998; DUA & AZURA-BLANCO, 1999). Possuem alta capacidade de proliferação, diferenciação e maturação (HALL & WATT, 1989; HAAMANN et al., 1998) e, são encontrados na porção basal do epitélio do limbo (HAAMANN et al., 1998).

Os movimentos centrípetos das “stem cells” na periferia da córnea, limbo e conjuntiva são responsáveis pela substituição do epitélio corneano; ressaltando-se que o índice mitótico da periferia é maior, comparativamente ao epitélio central (WAGONER, 1997).

Perdas epiteliais e de porções variadas do estroma definem-se como ceratite ulcerativa (STARTUP, 1984), onde a dor, a epifora, o blefarospasmo, a descarga ocular, a fotofobia e a uveíte reflexa são os sinais mais representativos (KERN, 1990). Dentre as várias causas capazes de motivar seu aparecimento, destacam-se os traumas, corpo estranho, anormalidades palpebrais, dos cílios e aparelho lacrimal (SLATTER, 1990). Citam-se ainda, as infecções virais e micóticas, e as deficiências nutricionais (HELPER, 1989), as queimaduras químicas e imunopatias (SLATTER, 1990).

Considerando-se diversidade de formas e fatores gênicos, as úlceras de córnea podem ser classificadas segundo diferentes critérios. Conforme a profundidade, por exemplo, podem ser divididas em úlceras superficiais, profundas e Descematocele. Úlceras superficiais reparam-se rapidamente, com mínima formação de cicatriz (DONZIS & MONDINO, 1987;

WHITLEY, 1991), e a reparação ocorre por migração e mitose das células basais, no curso de 4 a 7 dias (SLATTER, 1990; BANKS, 1992). Em casos em que há cronificação e retardo na formação de tecido cicatricial, pigmentos representados por melanócitos invadem as áreas lesadas comprometendo sua transparência (SLATTER, 1990).

Quando a lesão localiza-se no estroma profundo e infecções bacterianas cursam simultaneamente, o processo exudativo é mais complexo (SLATTER, 1990; COLLINS, 1996). O reparo de pequenas lesões ocorre pelo preenchimento de células epiteliais e se dá de maneira rápida (SLATTER, 1990). Lesões estromais demandam maior tempo para que sejam reparadas (NASSISSE, 1985). Em muitos casos, a regeneração depende de neovascularização apropriada, embora a cura ocorra em condições de avascularidade (WHITLEY, 1991). Como produto final do processo de reparação cicatricial, o arranjo irregular de fibras colágenas é condição comumente vista, e se manifesta sob as formas de nébula, mácula ou leucoma (SLATTER, 1990).

O sucesso no manejo das úlceras consiste no controle da infecção e redução da atividade de enzimas líticas, inibindo a recorrência de ulcerações e perfurações tardias (BROW et al., 1969; BROWN et al., 1970; BERMAN et al., 1971). Dentre os inibidores da collagenase, são citados a acetilcisteína (BURNS et al., 1989), a cisteína, o citrato, o ascorbato de sódio (DONZIS & MONDINO, 1987; BURNS et al., 1990; CHRISTMAS, 1991; WAGONER, 1997), o tripeptídeo β -mercaptometil, a tetraciclina sistêmica (BURNS et al., 1990), o EDTA sódico, o EDTA com cálcio e soro sanguíneo (REBHUN, 1981), entre outros. A eficácia dos derivados da tetraciclina em reduzir a atividade da collagenase deve-se a quelatação do zinco, impedindo a sua ligação ao sítio ativo da enzima e a “limpeza” de radicais livres gerados pelos polimorfonucleares (PMNs) (WAGONER, 1997).

Para promover a diferenciação das células epiteliais e a subsequente epitelização, alguns autores recomendam a utilização de sucedâneos da lágrima, fator de crescimento epidérmico, ácido retinóico, hialuronato de sódio (WAGONER, 1997) e fibronectina (BURNS et al., 1990; MORI et al., 1993). O fator de crescimento epidérmico estimula o DNA, o RNA e os precursores de proteínas das células epiteliais, além da migração desta (WAGONER, 1997).

Como resultado da inflamação intra-ocular, há intensa liberação de prostaglandinas. Por isso, tem sido proposto o uso de drogas anti-prostaglandinas sistêmicas, como o flunixin meglumine e o ácido acetilsalicílico e fármacos anti-prostaglandinas tópicos, como a indometacina e o flurbiprofeno (CHRISTMAS, 1991; WAGONER, 1997). Donshikk et al. apud DONZIS & MONDINO (1987) defendem a corticoterapia tópica durante a primeira semana de tratamento, inicialmente verificando-se a ausência de riscos de perfuração.

Os medicamentos oftálmicos devem ser isotônicos em relação ao filme lacrimal (PERCY, 1985) e suavemente alcalinos para não irritarem a superfície ocular. Não obstante, as drogas moderadamente ácidas são mais estáveis e possuem melhor penetração na córnea (BOOTH, 1992). As soluções são a forma mais comum de tratamento tópico, sendo prontamente eliminadas do olho, em permeio à lágrima (SLATTER, 1990). Por isso, admite-se que somente a 1 a 2% de uma solução aquosa oftálmica permaneça no olho após 30 minutos da instilação (PIERCY, 1985).

De acordo com estes últimos autores, os glicosaminoglicanos inibem, *in vitro*, as vias clássica e alternativa da cascata do complemento, com depleção de seus componentes e diminuição da inflamação. Além disso, sua atividade terapêutica no tratamento de artrites química, degenerativa e traumática pode ser atribuída predominantemente à inibição do complemento. Segundo BURNS et al. (1989), GLADE (1990) e CLEGG et al. (1998), os glicosaminoglicanos inibem ainda a degradação de colágeno pelas metaloproteínas - grupo de enzimas responsáveis pela degradação fisiológica e patológica da matriz extracelular do estroma - e, as proteases séricas, como a plasmina e o ativador de plasminogênio tecidual.

Burkhardt & Ghosh apud MILLER (1996) e WOUK et al. (1998) relatam que os glicosaminoglicanos polissulfatados atuam como inibidores da plasmina, de ativadores do plasminogênio, lisozimas e hialuronidase. Exibem efeito anabólico sobre fibroblastos, condrócitos e sinoviócitos e diminuem ainda, a síntese de prostaglandina E₂ e de radicais superóxidos, conferindo-lhes ação antiinflamatória.

MILLER (1996) e WOUK et al. (1998) estudaram os efeitos destas substâncias em úlceras recorrentes de cães e eqüinos, respectivamente. Ambos utilizaram uma solução oftálmica de glicosaminoglicanos polissulfatados a 5% e obtiveram a cicatrização de úlceras num período de 1 a 3 semanas após o trauma. Verificaram ainda, diminuição do

blefarospasmo nas primeiras 48 horas, permitindo que se comprovasse a ação antiinflamatória destas substâncias.

O prognóstico da evolução de córneas lesadas implica em considerar as possibilidades de perda de transparência corneana, a intensidade da isquemia ou necrose límbica e da conjuntiva bulbar (WAGONER, 1997), bem como a qualidade da neovascularização (BROWN et al., 1969). Assim classificam-se quatro estágios evolutivos, sendo o primeiro considerado favorável por não haver opacidade corneana ou isquemia límbica, com pouca ou nenhuma perda de “stem cells” (WAGONER, 1997). Em escala crescente, identifica-se o quarto estágio com prognóstico sombrio. Neste caso, a córnea encontra-se completamente opacificada, não permitindo visualização da íris. A isquemia ocupa mais da metade do limbo, há necrose na conjuntiva e esclera e completa perda das “stem cells” (WAGONER, 1997). E, segundo PFISTER (1983), para um melhor prognóstico, deve-se acompanhar a evolução por um período mínimo de 72 horas.

Face a existência de poucos dados na literatura técnica sobre o uso dos glicosaminoglicanos nas ceratites ulcerativas dos eqüinos e dos possíveis benefícios advindos do seu uso, o objetivo do presente trabalho será o de testar os efeitos clínicos do Sulfato de Condroitina “A” associado a Ciprofloxacina contra os efeitos de medicamento antibiótico usado na rotina dos tratamentos de úlceras corneanas de eqüinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Utilizaram-se dez olhos de cinco animais da espécie eqüina (*Equus caballus*), adultos, machos, de raças variadas, fornecidos pelo Regimento de Cavalaria Coronel Dulcídio da Polícia Militar do Paraná.

Com o objetivo de padronização dos animais e eliminação de variáveis indesejáveis, realizou-se exame geral de todos os indivíduos a fim de avaliar a higidez dos mesmos e, para tal, consideraram-se as técnicas semiológicas clínica e oftalmológica de rotina. Para este último, foram eleitos os seguintes: teste de lágrima de Schirmer, a biomicroscopia em lâmpada de fenda, a tonometria de aplanção, a oftalmoscopia binocular indireta e direta e a prova de fluoresceína. Após a seleção, os animais passaram por identificação e foram mantidos em baias individuais apropriadas, com a alimentação e cuidados adequados.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.2.1 Grupos experimentais

Designaram-se dois grupos de cinco olhos, sendo o olho direito o grupo controle, onde utilizou-se o tratamento com solução oftálmica estéril de tobramicina¹, na concentração a 0,3%. No grupo dos olhos esquerdos foi aplicado um colírio com associação de sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina².

2.2.2 Indução cirúrgica das úlceras de córnea

Inicialmente os animais passaram por uma tranquilização feita com neuroleptoanalgesia, uma associação de butorfanol³ 0,1mg/kg/p/v com acepromazina⁴ a 1%, 1mg/kg/p/v. Após alguns minutos, realizou-se bloqueio anestésico dos nervos auriculopalpebral e supraorbital com 5 ml de lidocaina⁵ a 2% sem vasoconstritor, promovendo analgesia e anestesia retro-bulbar. A anestesia da córnea foi completada com pomada

1 Tobrex® - Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

2 Ciprovet® - Labyes S. A.

3 Torbugesic® - Ford Dodge S. A.

4 Acepran® - Univet S. A.

oftálmica anestésica à base de lidocaína e prilocaína⁶. A trepanação (figura 7) das córneas foi realizada com um “punch” de 0,6 mm em posição de 12 horas no eixo pupilar. Em seguida, procedeu-se a eversão (figura 8) do bordo epitelial com pinça dente de rato, a fim de mimetizar o quadro clínico de úlcera indolente. Produzidas as lesões corneanas, realizou-se teste de fluoresceína (figura 9), o qual resultou positivo e, então aguardou-se um período de 24 horas para o início dos tratamentos.

2.2.3 Protocolo de Tratamento

Para avaliação clínica dos efeitos do sulfato de condroitina “A” e ciprofloxacina, esta medicação foi instilada a cada 12 horas, até a cicatrização das úlceras, tomando como parâmetro de cura a prova de retenção de fluoresceína negativa. No grupo de olhos controle foi feita instilação de colírio de tobramicina em intervalos de seis horas, durante o mesmo período de tempo e da mesma maneira que o outro grupo foi utilizado a prova de retenção ou fluoresceína para controle da cura total.

2.2.4 Avaliação Clínica

As córneas passaram por avaliações diárias mediante oftalmoscopia direta e prova de retenção de fluoresceína e em dias alternados por oftalmoscopia indireta e biomicroscopia em lâmpada de fenda. A análise dos parâmetros relacionados e blefarospasmo, fotofobia, epífora, quemose, edema e pannus foi realizada subjetivamente, sempre pelo mesmo examinador, de acordo com critérios quali-quantitativos, quais sejam: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

5 Lidocaína 2%® - Apsen do Brasil Ind. Quím. e Farm. Ltda.

6 Emla® - Astra Química e Farmacêutica Ltda.

2.2.5 Análise Estatística

Os dados quali-quantitativos referentes às observações clínicas como blefarospasmo, fotofobia, edema, epífora, neovascularização e epitelização foram analisados segundo o teste estatístico de Kruskal-Wallis (análise de variância de um fator para dados paramétricos), comparando-se os dois grupos e, para isso, utilizando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Obedecendo os critérios quali-quantitativos, verificou-se os seguintes resultados: tanto os olhos do grupo controle quanto os olhos do tratamento (100%) apresentaram blefarospasmo (figura 2) e fotofobia (figura 6) e 80% dos mesmos manifestaram epífora (figura 4), com duração média de três dias. O desaparecimento destes sinais clínicos ocorreu no grupo de cinco olhos tratados com associação de glicosaminoglicanos e ciprofloxacina (figura 11) dois dias antes do grupo controle, o qual permaneceu apresentando sinais de intensidade leve até o quinto dia (figura 10). O edema (figura 3) de córnea foi observado em todos os olhos, sendo que no grupo tratado desapareceu em três dias e no grupo controle reduziu-se em um período médio de cinco dias.

A partir do quinto dia de tratamento com associação de sulfato de condroitina e ciprofloxacina, três olhos (dos cinco olhos tratados) apresentaram preenchimento do leito da úlcera em plano estromal (figura 1), porém ainda positivo ao teste de fluoresceína. Os outros dois olhos observados apresentaram-se em início de preenchimento da úlcera com tecido cicatricial a termo (figura 13). Através da oftalmoscopia direta pode-se observar pequena neovascularização da córnea.

Aos dez dias de tratamento com sulfato de condroitina e ciprofloxacina, constatou-se que quatro olhos apresentavam maior evolução de organização cicatricial com discreto leucoma (figura 17). O quinto olho mostrou-se nesta fase com preenchimento do leito da úlcera por tecido cicatricial em plano epitelial.

Com 16 dias de evolução do tratamento, 80% dos olhos tratados (quatro olhos) apresentaram completa cicatrização (figura 19), constatada pelo resultado negativo da prova de fluoresceína. Não foi observado sinal de leucoma. As córneas ainda apresentavam-se transparentes, sem sinais de vascularização, nem mesmo vasos fantasma. Os outros 20% dos olhos tiveram a resolução da úlcera completada em média com 21 dias de tratamento. Todas as cicatrizações do grupo de tratamento ocorreram sem formação de leucoma ou neovascularização (figura 21).

Nos olhos do grupo controle observou-se com 9 dias, ulceração ainda presente em 80% dos mesmos (figura 12 e 14) e início do preenchimento do leito ulcerado em 20% dos olhos. Em todos os olhos observou-se edema e neovascularização (figura 5) intensos - “pannus”. Apenas com 10 dias de tratamento verificou-se o início do preenchimento do leito das úlceras com tecido cicatricial (figura 16) e após 15 dias de evolução, notou-se diminuição do “pannus” (figura 18).

Após 20 dias de tratamento com colírio de tobramicina, observou-se completa cicatrização da úlcera e o teste de retenção de fluoresceína resultou negativo. Com 30 dias observava-se ainda a presença de discreto leucoma. Aos 90 dias de observação, notou-se transparência corneana completa, sem alguma presença de leucoma em quase todos os olhos do grupo controle e aos cinco meses, verificou-se em um olho discreto leucoma (figura 20).

Os resultados clínicos obtidos podem ser melhor visualizados nas tabelas (1 e 2) que se seguem.

Tabela 1 – Critérios quali-quantitativos observados nos olhos de eqüinos tratados com tobramicina tópica no grupo de olhos controle (olho direito) durante as avaliações clínicas. Critérios quali-quantitativos dos sinais: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

SINAIS CLÍNICOS	DIAS																								
	1º DIA					3º DIA					5º DIA					7º DIA					9º DIA				
Blefarospasmo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	+		+																					
Fotofobia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	+	+	+	+	+	+																		
	+	+	+																						
Epífora	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	+		+																					
Quemose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	+	+		+	+					+				+											
				+																					
Neovascularização	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
											+			+		+		+							
																			+						
Epitelização	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
																								+	+
																								+	+
Identificação dos animais	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

EPITELIZAÇÃO

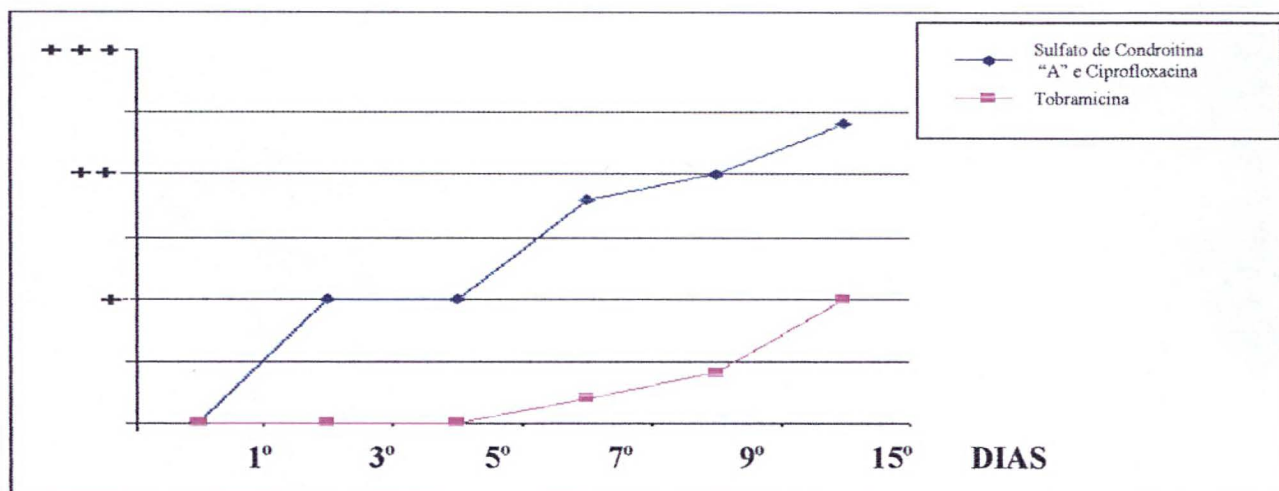


FIGURA 1 – Ocorrência, em dias, da epitelação da córnea de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina "A" e ciprofloxacina. Grau de intensidade dos sinais: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

BLEFAROSPASMO

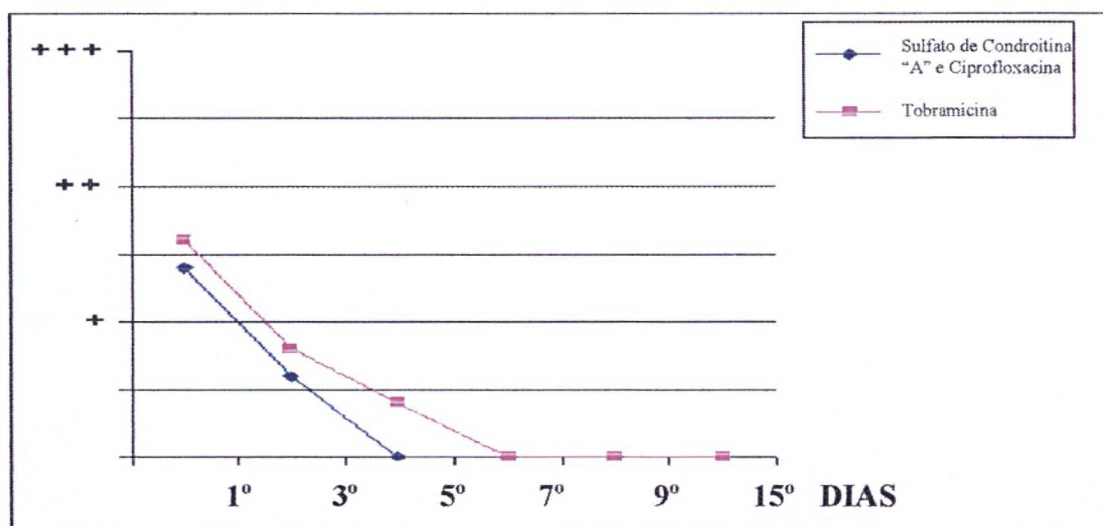


FIGURA 2 – Ocorrência, em dias, de blefarospasmo em olhos de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina "A" e ciprofloxacina. Grau de intensidade dos sinais: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

EDEMA

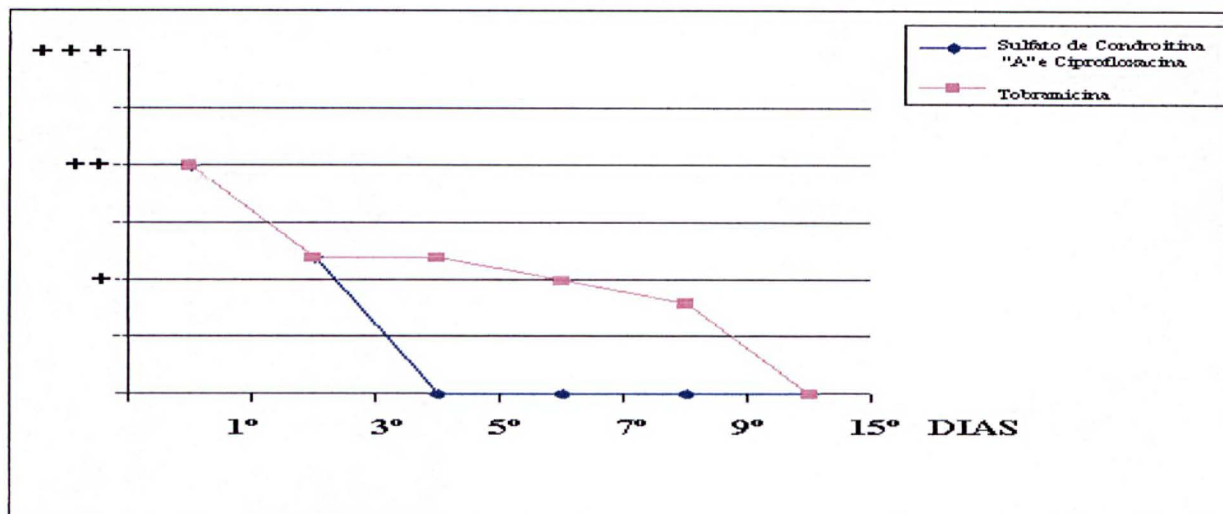


FIGURA 3 – Ocorrência, em dias, de edema em córneas de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina "A" e ciprofloxacina. Grau de intensidade dos sinais: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

EPÍFORA

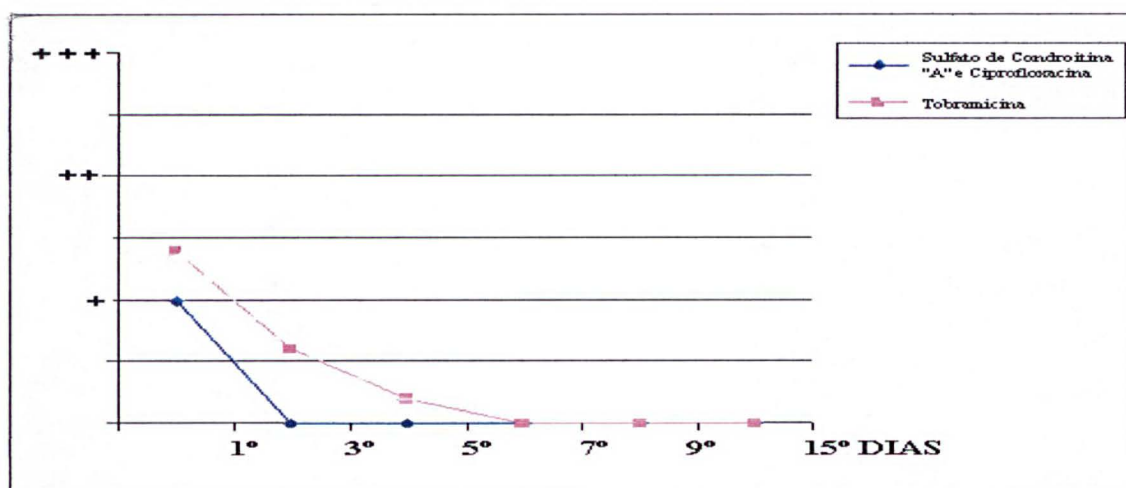


FIGURA 4 – Ocorrência, em dias, de epífora em olhos de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina "A" e ciprofloxacina. Grau de intensidade dos sinais: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

NEOVASCULARIZAÇÃO

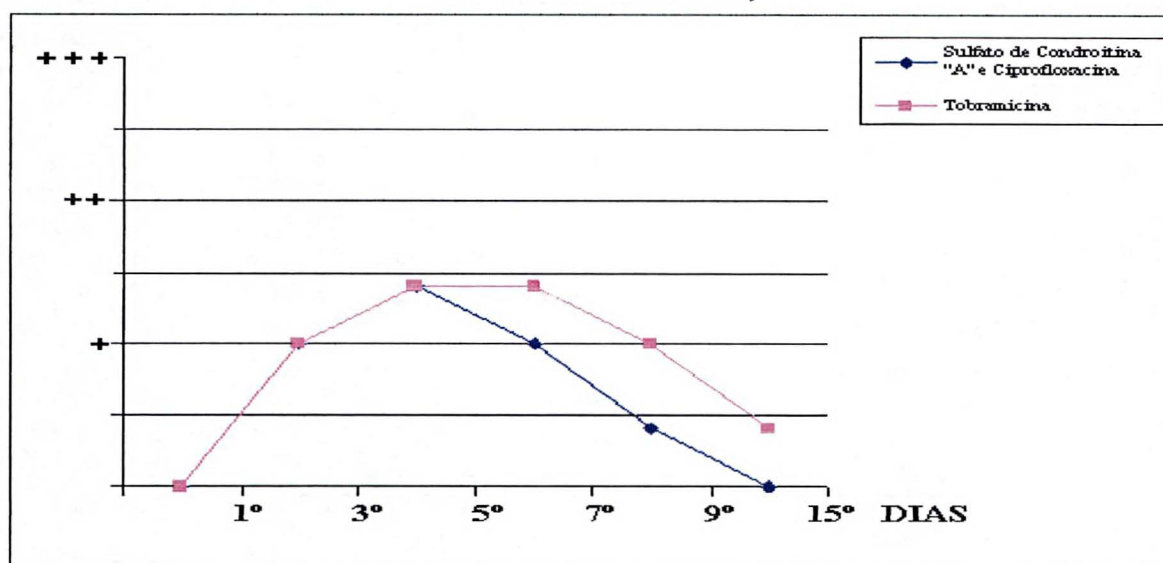


FIGURA 5 – Ocorrência, em dias, de neovascularização em córneas de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina "A" e ciprofloxacina. Grau de intensidade dos sinais: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

FOTOFOBIA

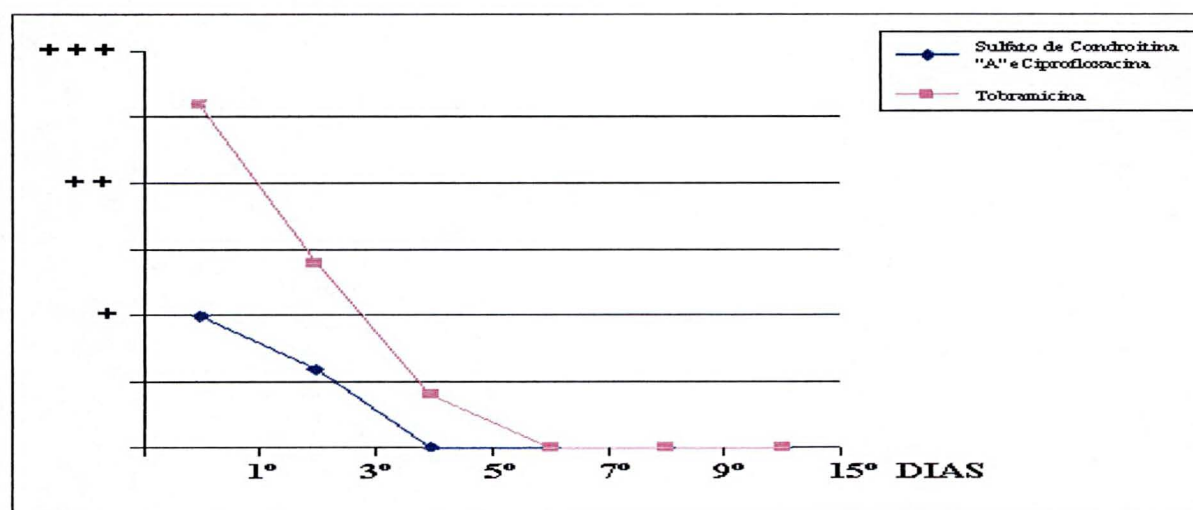


FIGURA 6 – Ocorrência, em dias, de fotofobia em olhos de eqüinos tratados topicamente com tobramicina e a associação de sulfato de condroitina "A" e ciprofloxacina. Grau de intensidade dos sinais: (0) ausência de sinais, (+) sinais discretos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

FIGURA 7- Imagem de olho eqüino submetido à trepanação da córnea no eixo pupilar.



FIGURA 8 – Imagem de olho eqüino com eversão do bordo epitelial corneano, após trepanação (seta).

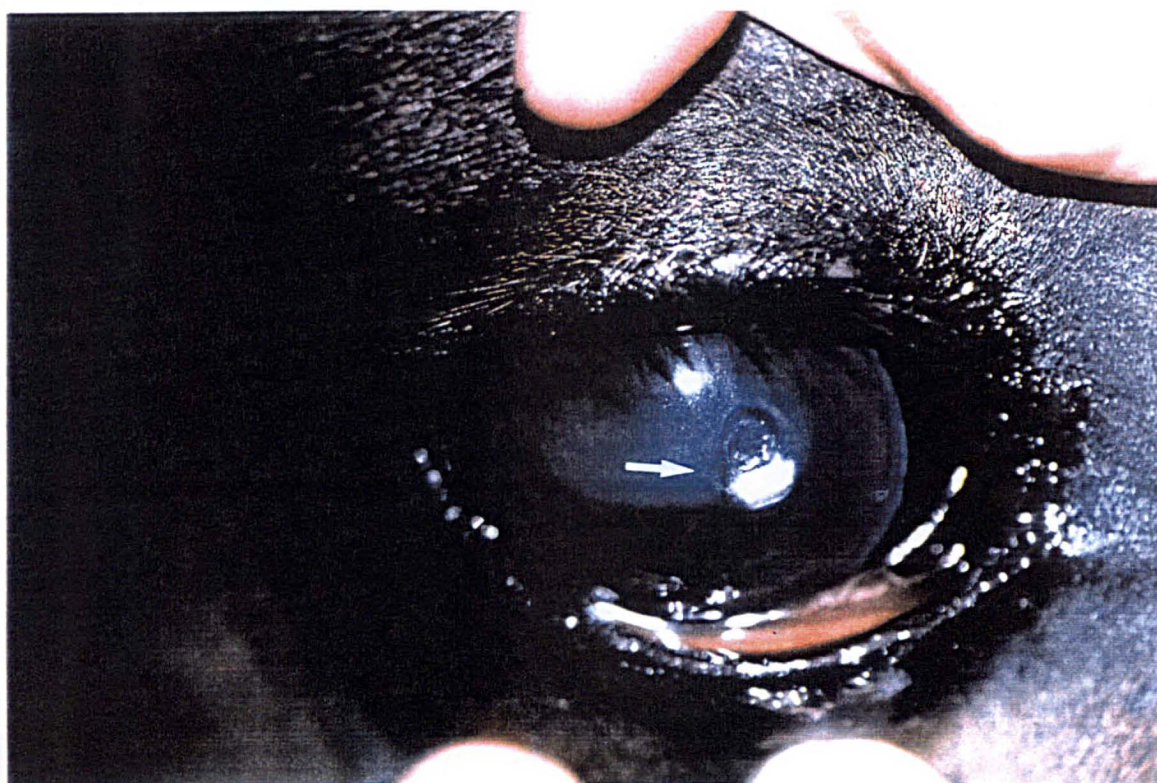


FIGURA 9 – Imagem de olho eqüino com úlcera experimental de córnea corada pela fluorsceína (seta).

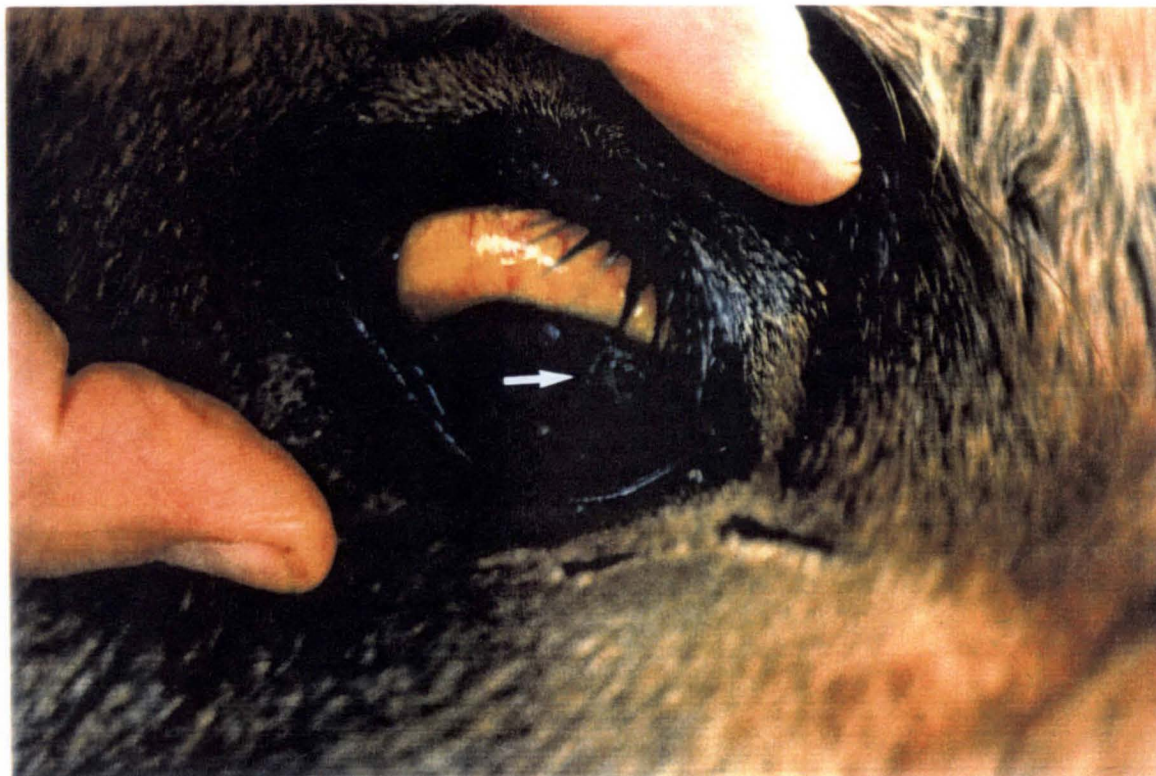


FIGURA 10 – Imagem de olho direito (controle) eqüino com cinco dias de evolução: notar a presença de edema e úlcera com fundo transparente em posição de “11 horas” (seta).



FIGURA 11 - Imagem de olho esquerdo (associação de condroitina "A" e ciprofloxacina) equino com cinco dias de evolução: notar leucoma com ausência de edema e, epiteliação presente.



FIGURA 12 – Imagem de olho direito (controle) equino aos nove dias de tratamento: notar presença de úlcera corneana recém epitelizada (seta).



FIGURA 13 – Imagem de olho esquerdo eqüino aos nove dias de tratamento com associação de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar presença de discreto leucoma (seta).



FIGURA 14 – Imagem de olho direito (controle) eqüino aos nove dias de tratamento: notar presença de úlcera em atividade com fundo transparente em posição de “6 horas” (seta).

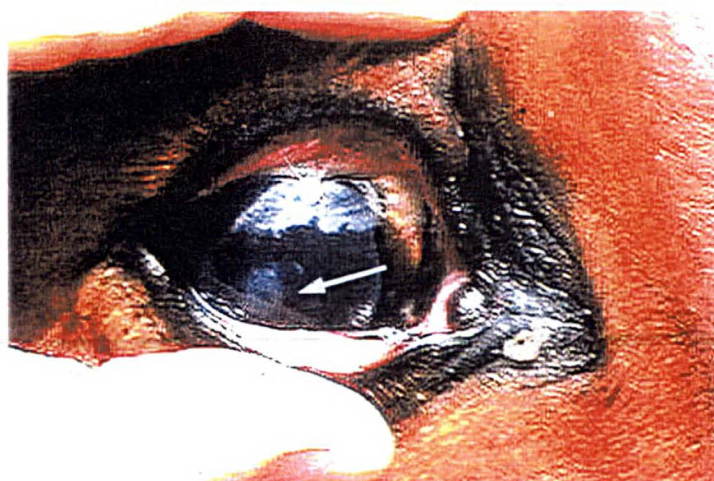


FIGURA 15 – Imagem de olho esquerdo eqüino aos nove dias de tratamento com associação de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar cicatrização a termo com discreto leucoma (seta).



FIGURA 16 – Imagem de olho direito (controle) eqüino aos dez dias de tratamento: notar presença de úlcera corneana recém epitelizada (seta).

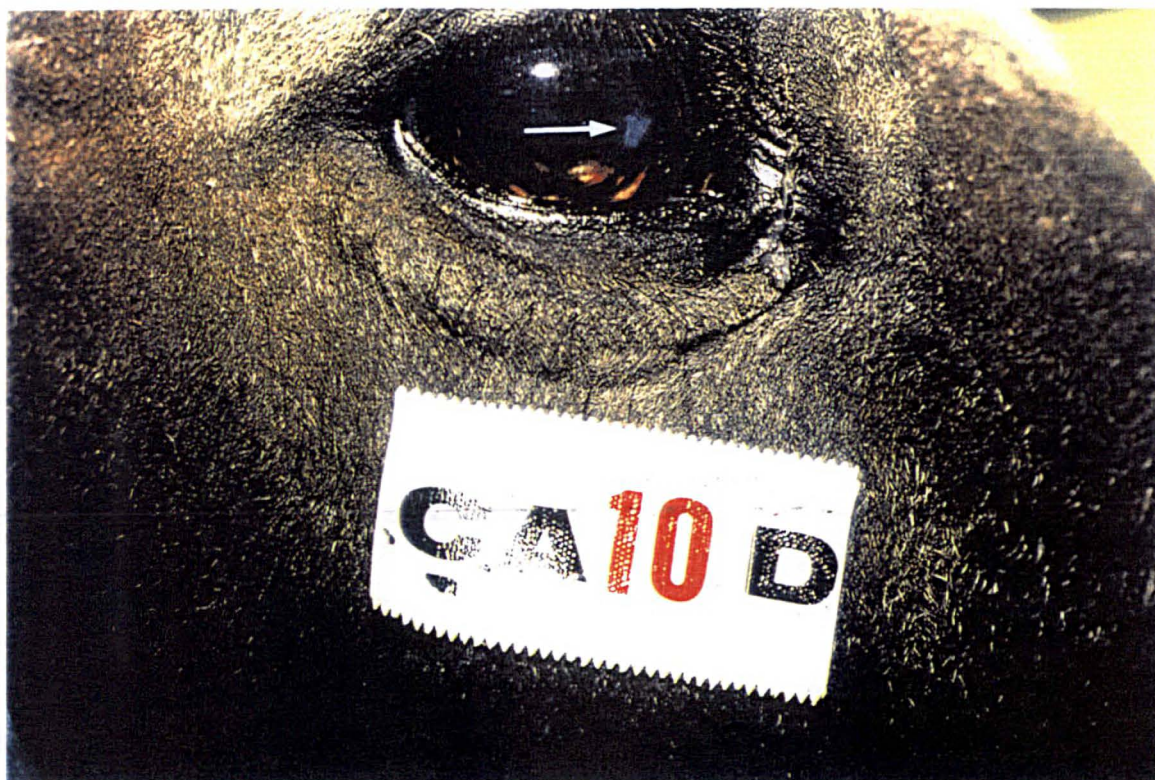


FIGURA 17 – Imagem de olho esquerdo eqüino aos 10 dias de tratamento com associação de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar presença de discreto leucoma (seta).



FIGURA 18 – Imagem de olho direito (controle) eqüino aos 15 dias de tratamento: notar presença de leucoma denso (seta).



FIGURA 19 – Imagem de olho esquerdo equino aos 15 dias de tratamento com associação de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar presença de discreto leucoma (seta).

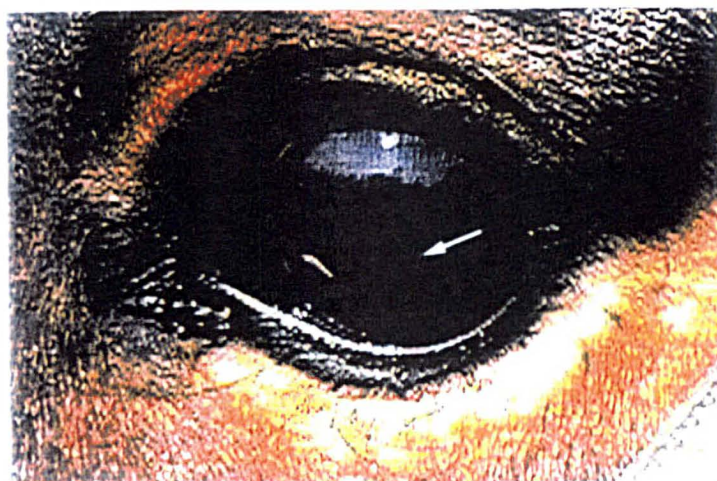


FIGURA 20 – Imagem de olho direito (controle) equino aos cinco meses de evolução: notar presença de leucoma (seta).



FIGURA 21 – Imagem de olho esquerdo eqüino aos cinco meses de evolução, após tratamento com associação de condroitina “A” e ciprofloxacina: notar ausência de leucoma.



3.2 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os sinais clínicos analisados e comparados entre os dois grupos nos diferentes dias, conforme o teste de Kruskal-Wallis. Como parâmetro de intensidade das manifestações clínicas utilizou-se: (0) para ausência de sinais clínicos, (+) presença de sinais discretos, (++) moderados e (+++) intensos. Encontrou-se diferença significativa em relação ao edema no sétimo dia ($p=0,0254$), à neovascularização no quinto dia ($p=0,0254$) e à epitelização no nono dia ($p=0,0254$). Comparando-se os demais sinais, não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores mínimos significativos (p) do teste de análise de variância para dados não paramétricos (Kruskal-Wallis) para os sinais clínicos em cada dia, onde $p < 0,05$ indica diferença significativa.

Sinais Dias	Blefarospasmo	Quemose	Fotofobia	Epífora	Edema	Neovascularização	Epitelização
1 dia	1	1	0,2482	1	0,5762	1	1
3 dias	1	1	0,1360	1	0,5762	1	0,5762
5 dias	0,3613	1	0,1709	1	0,5762	0,0254*	0,5762
7 dias	1	1	1	1	0,0254*	0,1709	0,5762
9 dias	1	1	1	1	1	1	0,0254*
15 dias	1	1	1	1	1	0,3613	0,5762

*Valores de $p < 0,05$

4. DISCUSSÃO

As úlceras corneanas estão entre as afecções oculares mais comuns na espécie equina (DAVIDSON, 1991) e, por isso decidiu-se estudá-las como modelo crítico para o estudo da eficácia do farmaco na cicatrização das mesmas, frente à grande morbidade com que esta afecção acomete as espécies animais. Independente da causa inicial, todas as úlceras têm o potencial de progredir para uma endoftalmite quando não tratadas.

Dentre as várias causas existentes, citam-se: trauma, entrópio, corpo estranho, ceratomicose e erosões corneanas superficiais na espécie equina (SLATTER, 1992). Nesta pesquisa empregou-se o modelo de trefinação para a confecção das úlceras corneanas, a fim de avaliar clinicamente a cicatrização das mesmas com o uso de glicosaminoglicano polissulfatado associado à ciprofloxacina.

O epitélio corneano normal é uma barreira muito eficiente contra as bactérias invasoras. Se as úlceras se infectam ou o epitélio é incapaz de se unir ao estroma subjacente, a cicatrização é atrasada e pode progredir para uma ulceração profunda ou até mesmo perfuração. A progressão da lesão pode estar limitada a um setor reduzido da córnea ou pode afetar todo o tecido corneano (SLATTER, 1992).

Inadequada reposição de colágeno, úlceras e perfurações subseqüentes podem resultar da atividade da collagenase. Esta última, juntamente com outras proteases são produzidas durante a cicatrização corneana normal e ajuda na remoção de células desvitalizadas e outros debris da córnea. No entanto, em alguns casos, estas enzimas contribuem para uma falha progressiva e rápida “melting” do estroma corneal (WHITLEY, 2000).

A glicoproteína fibronectina apresenta importante papel no processo inicial de reparação de lesões corneanas, pois ela permite que as células epiteliais ancorem-se à membrana basal e ainda promove migração celular e organização do tecido conectivo da córnea (MILLER, 1996).

Idealizou-se o estudo dos efeitos da solução tópica de sulfato de condroitina a 5% associada à ciprofloxacina sobre a cicatrização de úlceras corneanas profundas induzidas

experimentalmente com tréfinas em equinos, devido a conhecida ação antiinflamatória do glicosaminoglicano, através da inibição das vias clássicas e alternativa do complemento (RASHMIR-RAVEN et al, 1992) e da diminuição da síntese de prostaglandina E2 e de radicais livres superóxidos; sobre a degradação do colágeno por inibição das metaloproteinases e das proteases séricas, especialmente a plasmina – uma enzima conhecida pelo seu efeito de degradativo sobre a fibronectina – e, pelo efeito anabólico sobre fibroblastos (MILLER, 1996; WOUK et al, 1998).

No presente estudo, o sulfato de condroitina foi utilizado conforme proposto por MILLER (1996) no tratamento de ceratites ulcerativas do cão de raça Boxer e, WOUK et al (1998) em úlcera corneana indolente em equinos. Os bons resultados puderam ser corroborados também nesta pesquisa, quando da utilização do glicosaminoglicano no tratamento das úlceras profundas experimentalmente induzidas.

Os períodos escolhidos para avaliação clínica da evolução das úlceras corneanas respeitaram as fases clássicas da reparação cicatricial, encontrados em citação literária de SLATTER (1990).

Somando-se aos resultados encontrados por MILLER (1996) e WOUK et al (1998) blefarospasmo e fotofobia discretos a moderados foram significativos nos dois dias subseqüentes à indução da lesão, uma vez que os glicosaminoglicanos produzem efeito próprio de rápida redução do desconforto através das suas ações antiinflamatórias. Ainda concordando com os achados de MILLER (1996), o conforto ocasionado pela redução dos sinais clínicos acima mencionados não foi associado com a cicatrização das úlceras corneanas, uma vez que os animais necessitaram de mais de uma semana para a cicatrização das mesmas, o que faz crer em uma ação anti-prostaglandina por parte dos glicosaminoglicanos.

Epífora discreta foi constatada somente na primeira avaliação clínica dos olhos controle e permaneceu somente durante as 24 horas após o início dos sinais clínicos, não corroborando os estudos de MILLER (1996) e WOUK et al. (1998), os quais notaram redução deste parâmetro após 48 horas, 48 e 72 horas, respectivamente.

Quemose não foi verificada em nenhum dos olhos do grupo de tratamento com sulfato de condroitina, o que vai de encontro aos dados colhidos por WOUK et al. (1998). O

edema corneano apresentou-se de modo discreto, moderado a intenso entre todos os animais, mas persistiram somente até os três dias subsequentes à lesão nos olhos tratados com sulfato de condroitina, enquanto continuaram até o nono dia no grupo de olhos controle. Isto se deve muito provavelmente ao efeito antiinflamatório do glicosaminoglicano instilado sobre os olhos esquerdos, tratados com o mesmo.

A neovascularização discreta à moderada foi encontrada tanto nos olhos do grupo de tratamento quanto nos olhos controle a partir do terceiro dia; no entanto, nestes últimos, permaneceu até o 15º dia, enquanto que no grupo de olhos esquerdo foi visível até o nono dia em somente um animal e isto se deve, muito provavelmente, em resposta à presença da ação antiinflamatória do sulfato de condroitina instilado nos olhos tratados.

A ocorrência de um preenchimento mais rápido do leito das úlceras por tecido estromal organizado nos olhos tratados, deve-se a ação do glicosaminoglicano, auxiliando na síntese de colágeno organizado, corroborando achados anteriores de MILLER (1996) e WOUK et al. (1998).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a presente pesquisa permitiram concluir que a instilação tópica de uma associação de sulfato de condroitina a 5% com ciprofloxacina promove a cicatrização mais rápida de úlceras corneanas induzidas experimentalmente em eqüinos, além de evitar a formação de cicatrizes na córnea e reduzir as manifestações de origem inflamatória.

6. REFERÊNCIAS

BANKS, W.J. Olho e ouvido. In: _____. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 589-617.

BERMAN, M. B. et al. Characterization of collagenolytic activity in the ulcerating cornea. **Experimental Eye Research**, v. 11, n. 6, p. 255-261, 1971.

BOOTH, N. H. Agentes tópicos. In: BOOTH, H. H., Mc DONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 581-599.

BROWN, S. I. et al. Prevention of the ulcers of the alkali-burned cornea. **Archives of Ophthalmology**, v. 82, p. 95-97, 1969.

BROWN, S. I. et al. Pathogenesis of ulcers of the alkali-burned cornea. **Archives Ophthalmology**, v. 83, p. 205-208, 1970.

BURNS, F. R. et al. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 30, n. 7, p. 1569-1575, 1989.

BURNS, F. R. et al. Inhibition of alkali-induced corneal ulceration and perforation by a thiolpeptide. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 31, n. 1, p. 107-114, 1990.

CHRISTHMAS, R. Management of chemical burns of the canine cornea. **Canine Veterinary Journal**, v. 32, p. 608-612, 1991.

CLEGG, P. D. et al. The effect of drugs commonly used in the treatment of equine articular disorders on the activity of equine matrix metalloproteinase 2 and 9. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 21, p. 406-413, 1998.

COLLINS, B. K. Afecções do globo ocular: córnea e esclerótica. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1996. p. 152-162.

DAVIDSON, M. G. Equine Ophthalmology. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 2nd ed. London: Lea & Febiger, 1991. p. 576-610.

DONZIS, P. B., MONDINO, P. J. Management of noninfectious corneal ulcers. **Survey Ophthalmology**, v. 32, p. 94, 1987.

DONZIS, P. B., MONDINO, B. J. Diagnostic and surgical techniques. **Survey Ophthalmology**, v. 32, n.2, p. 94-110, 1987.

DUA, H. S., AZUARA-BLANCO, A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. **Brasilian Journal Ophthalmology**, v. 83, p. 414-419, 1999.

DUA, H. S. The conjuntival in corneal epithelial wound healing. **Brasilian Journal Ophthalmology**, v. 82, p. 1407-1411, 1998.

EICHENBAUM, J.D. et al. Immunology of the ocular surface. **Compendium of Continuous Education**, v. 9, n. 11, p. 1101-1109, 1987.

FINI, M.E. et al. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. **Acta Ophthalmol.**, v. 70, p. 26-33, 1992.

GIRARD, L.J. Cornea surgery. In: _____. **Advanced Techniques in Ophthalmic Microsurgery**. Sant Louis: CV Mosby, 1981. p. 2-26.

GLADE, M. J. Polysulfated glycosaminoglycans accelerates net synthesis of collagem and glycosaminoglycans by arthritic equine cartilage tissue and chodrocytes. **American Journal Veterinary Research**, v. 51, n. 5, p. 779-785, 1990.

HAAMANN, P. et al. Limbal autograff transplantation. **Acta ophthalmol. Scand.**, v. 76, p. 117-118, 1998.

HALL, P.A., WATT, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, v. 106, p. 619-633, 1989.

HELPER, L.C. Diseases and surgery of the cornea and sclera. In: _____. **Magrane's Canine Ophthalmology**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p. 102-149.

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **The Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 643-666, 1990.

KIRSCHNER, S.E. et al. Ultraestructural morphology of persistent corneal erosion in dogs: a preliminary report. **Trans. An. Coll. Vet. Ophthalmol.**, v. 17, p. 486, 1986.

MILLER, W. W. Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs. **Veterinary Medicine**, v. 91, p. 916-922, 1996.

MORI, E. M. et al. Fibronectina tópica no tratamento de úlceras de córnea de coelho após queimadura por álcali. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 56, n. 5, p. 254-257, 1993.

MURPHY, C.V., POLLOCK, R.V.S. The eye. In: EVANS, H.E. **Miller's Anatomy of the Dog**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 1009-1057.

NASSISSE, M. P. Canine ulcerative keratitis. **Compendium of Continuous Education**, v. 7, n. 9, p. 686-701, 1985.

NAUNMANN, G.O.H., SAUTTER, H. Surgical procedures on the cornea. In: BLODI, F.C., MACKENSEN, G., NEUBAUER, H. **Surgical Ophthalmology**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 434-440.

PFISTER, R. R. The effects of chemical injury on the ocular surface. **Ophthalmology**, v. 90, n. 6, p. 601-609, 1983.

PIERCY, D. W. T. Factors influencing the penetration of therapeutic substances into the eye following topical application. **Veterinary Records**, v. 116, n. 4, p. 99-104, 1985.

RASHIMIR-RAVEN, A. M. et al. Inhibition of equine complement activity by polysulfated glycosaminoglycans. **Americans Journal Veterinary Research**, v. 53, n. 1, p. 87-90, 1992.

REBHUN, W. C. Bacterial ulcers equine cornea. **Equine Practice**, v. 3, n. 3, p. 40-47, 1981.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic embryology and anatomy. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 3-123.

SAMUELSON, D. A. . Ophthalmic anatomy. In: _____. **Veterinary Ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1999. p. 31-150.

SCHOENAU, L.S.F., PIPPI, N.L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea. Uma breve revisão. **A Hora Veterinária**, v.12, n. 1, p. 49-53, 1993.

SEVERIN, G. A. Córnea. In: _____. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. Buenos Aires: **Editorial Hemisfério Sur**, 1991. p. 113-142.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In: _____. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p. 257-303.

SLATTER, D. Cornea and esclera. In: _____. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 2^a ed. Buenos Aires: Intermédica, 1992. p. 257-303.

STARTUP, F. C. Corneal ulceration in the dog. *Journal Small Animal Practice*, v. 25, p. 737-752, 1984. HALL, P.A., WATT, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, v. 106, p. 619-633, 1989.

SWIFT, G. J. et al. Survival of rabbit limbal stem cell allografts. **Transplantation**, v. 62, n. 5, p. 568-574, 1996.

WAGONER, M.D. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. **Survey Ophthalmology**, v. 41, n. 4, p. 275-313, 1997.

WARING, G.O. Corneal structure and pathophysiology. In: LEIBOWITZ, H. **Corneal Disorders: Clinical Diagnosis and Management**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p. 3-25.

WHITLEY, R. D. Infectious disease and the eye. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1098-1380, 2000.

WHITLEY, R. D., GILGER, B. C. Diseases of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 635-655.

WHITLEY, R. D. Canine corneas. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 307-356.

WOUK, A. F. P. F. et al. Polysulfated glycosaminoglycan used for the treatment of indolent corneal ulcers in equine patients. **Rivista Società Italiana di Ippologia**, v. 4, n. 1, p. 87-90, 1998.